

明細書

ペントースー5-リン酸エステルの製造方法。

技術分野

[0001] 本発明は、ペントースー5-リン酸エステルの製造方法に関する。さらに詳しくは、医薬品および機能化学品の製造原料の一つであるヌクレオシド類を合成する出発物質として有用なペントースー5-リン酸エステルの製造方法に関する。

背景技術

[0002] ペントースー5-リン酸エステルは、ヌクレオシド類を合成する出発物質として有用な化合物である。例えば、2-デオキシリボースー5-リン酸エステルをホスホペントムターゼにより2-デオキシリボースー1-リン酸エステルに変換し、次いでヌクレオシドホスホリラーゼによって各種核酸塩基とグリコシル化することにより、各種デオキシリボヌクレオシド類を製造する方法が報告されている(特許文献1)。この製造方法で用いられている2-デオキシリボースー5-リン酸エステルは、DNAの酵素による加水分解により調製されているが、この調製方法は、原料となるDNAが高価であり、分離・精製の工程の多い方法である。

[0003] また、デオキシリボキナーゼを2-デオキシリボースならびにリン酸供与体であるアデノシントリリン酸(ATP)に作用させ、2-デオキシリボースー5-リン酸エステルを生成させる方法も報告されている(非特許文献1)。しかしながら、この方法に用いられるATPは高価である。

[0004] ATPに比べて安価なポリリン酸をリン酸供与体とし、仔ウシ腸に由来するアルカリホスファターゼを用いて有機ヒドロキシル化合物をリン酸化する方法も報告されている(特許文献2)。ここには、有機ヒドロキシル化合物として、アルコール類であるグリセロール、糖類であるD-グルコースおよびD-リボースを使用した実験が記載されている。D-グルコースおよびD-リボース等の糖類には分子内に複数個の水酸基が存在するが、該糖類の分子内に存在する水酸基のうちのどの水酸基にリン酸基が導入されるのかについては明らかにされていない。

[0005] ホスファターゼは反応至適pHの違いによって酸性ホスファターゼとアルカリホスファ

ターゼに分類される。酸性ホスファターゼを用いたリン酸化反応としてヌクレオシドおよびグルコースのリン酸化反応が報告されている(非特許文献2、非特許文献3)。しかしながら、これまで酸性ホスファターゼによるペントースのリン酸化反応を示した例はない。

特許文献1:WO01／14566

特許文献2:特開平01-27484

非特許文献1:Arch. Biochem. Biophys. ,164,1974

非特許文献2:J. Biosci. Bioeng. ,92, 2001

非特許文献3:Org. Biomol. Chem. ,1, 2003

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ペントース-5-リン酸エステルを簡便に製造する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく銳意検討した結果、ペントースとポリリン酸との

反応を酸性ホスファターゼの存在下で行うことにより、ペントース-5-リン酸エステルのみが選択的に得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] すなわち本発明は、ペントースとリン酸供与体とを酸性ホスファターゼの存在下で反応させるペントース-5-リン酸エステルの製造方法に関するものである。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、2-デオキシリボース等のペントースとピロリン酸等のリン酸供与体とから、選択的かつ簡便に2-デオキシリボース-5-リン酸エステル等のペントース-5-リン酸エステルを製造することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]デオキシリボース(以下、「dR」と略記する。)に対してピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液の濃度を100mM～700mMに変えて反応させて得られた結果を示

す図である。

[0011] [1]dR／ピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液=100／100

[2]dR／ピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液=100／300

[3]dR／ピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液=100／500

[4]dR／ピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液=100／700

[図2]反応液中の活性値を0.73U/mL～7.3U/mL(0.5～5.0mg湿菌体/mL)に変えて反応させて得られた結果を示す図である。

[0012] [1]0.73U/mL(0.5mg湿菌体/mL)

[2]1.5U/mL(1.0mg湿菌体/mL)

[3]3.6U/mL(2.5mg湿菌体/mL)

[4]7.3U/mL(5.0mg湿菌体/mL)

発明を実施するための最良の形態

[0013] 本明細書において、「ペントース」とは、「リボース、キシロース、アラビノース、リキソース、1～3位の水酸基が水素原子に置換されたリボース、1～3位の水酸基が水素原子に置換されたキシロース、1～3位の水酸基が水素原子に置換されたアラビノース、1～3位の水酸基が水素原子に置換されたリキソース、1～3位の水酸基が炭素数1～5のアルコキシル基に置換されたリボース、1～3位の水酸基が炭素数1～5のアルコキシル基に置換されたキシロース、1～3位の水酸基が炭素数1～5のアルコキシル基に置換されたアラビノースまたは1～3位の水酸基が炭素数1～5のアルコキシル基に置換されたリキソース」を意味するものと定義する。

[0014] ペントースとリン酸供与体とを酸性ホスファターゼの存在下で反応させることによりペントース-5-リン酸エステルを製造することができる。

[0015] 本発明に使用されるペントースとしては、例えば、リボース、キシロース、アラビノース、リキソース、2-デオキシリボース、2-デオキシキシロース、2-デオキシアラビノース、2-デオキシリキソース、1-メトキシリボース、1-メトキシキシロース、1-メトキシアラビノース、1-メトキシリキソース、1-メトキシ-2-デオキシリボース、1-メトキシ-2-デオキシキシロース、1-メトキシ-2-デオキシアラビノースおよび1-メトキシ-2-デオキシリキソース等が挙げられる。これらはD体であってもL体であっても構わない。

- [0016] ペントース中には不斉炭素原子が存在する。本発明に使用されるペントースとして、3位および4位の立体配置が(3S、4R)または(3R、4S)であるペントースは好ましい。
- [0017] 本発明に使用されるペントースとして、リボース、アラビノース、2-デオキシリボースおよび1-メトキシ-2-デオキシリボースはより好ましい。
- [0018] 本発明に使用されるリン酸供与体としては、酸性ホスファターゼの存在下でペントースにリン酸基を与えてペントース-5-リン酸エステルを製造しうるものであれば制限はなく、例えば、ポリリン酸またはその塩が挙げられる。
- [0019] ポリリン酸またはその塩としては、ピロリン酸、トリポリリン酸、テトラポリリン酸、およびこれらのナトリウム塩もしくはカリウム塩等のアルカリ金属塩が挙げられる。
- [0020] これらのリン酸供与体は単独で使用してもよく、また二種類以上を併用することもできる。
- [0021] 前記のリン酸供与体の中でも、ピロリン酸またはピロリン酸のカリウム塩は好ましい。
- [0022] 本発明に使用される酸性ホスファターゼとしては、ペントースの5位の炭素原子にリン酸基を導入する反応を触媒するものであれば特に制限はなく、種々の生物由来の酸性ホスファターゼが使用できる。例えば、*Aspergillus ficuum*等のカビに由来するフィターゼ、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schwanniomyces occidentalis*等の酵母に由来するフィターゼ、*Enterobacter aerogenes*、*Escherichia blattae*、*Klebsiella planticola*、*Morganella morganii*、*Prevotella intermedia*、*Providencia stuartii*、*Salmonella typhimurium*、*Shigella flexneri*、*Zymomonas mobilis*等の細菌に由来する酸性ホスファターゼ、ニワトリ等の動物に由来する酸性ホスファターゼ、ジャガイモ等の植物に由来する酸性ホスファターゼ等が挙げられ、これらは市販品として入手できるものもある。これらの中でも、*Shigella flexneri*(*Shigella*属)、*Schwanniomyces occidentalis*(*Schwanniomyces*属)、*Aspergillus ficuum*(*Aspergillus*属)由来の酸性ホスファターゼは好ましい。
- [0023] 近年の分子生物学および遺伝子工学の進歩により、目的遺伝子を公知の遺伝子工学的手法により製造および取得することが容易になった。そのため、前記の微生物が産生する酸性ホスファターゼの分子生物学的な性質やアミノ酸配列等を解析す

ることにより、該酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を該微生物株より取得し、該遺伝子および発現に必要な制御領域が挿入された遺伝子組換えプラスミドを構築し、これを任意の宿主に導入し、酸性ホスファターゼを産生する遺伝子組換え体を作出することができる。

- [0024] ここでいう発現に必要な制御領域とは、プロモーター配列(転写を制御するオペレーター配列を含む)・リボソーム結合配列(SD配列)・転写終結配列等を示している。バクテリアを宿主とした場合、プロモーター配列の具体例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンのtrpオペレーター、ラクトースオペロンのlacオペレーター、ラムダファージ由来のPLプロモーターおよびPRプロモーター、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター、アルカリプロテアーゼプロモーター、中性プロテアーゼプロモーター、 α -アミラーゼプロモーター等が挙げられる。また、tacプロモーターのように独自に改変・設計された配列も利用できる。リボソーム結合配列としては、大腸菌由来または枯草菌由来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。例えば、16SリボソームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列をDNA合成により作成してこれを利用してもよい。また、酸性ホスファターゼの上流に位置しているSD配列が利用できるのであれば、そのSD配列を利用するのが好ましい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 ρ 因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター、trpオペロンターミネーター等が利用できる。これら制御領域の組換えプラスミド上での配列順序は、5'末端側上流からプロモーター配列、リボソーム結合配列、酸性ホスファターゼをコードする遺伝子、転写終結配列の順に並ぶことが望ましい。ここでいうプラスミドの具体例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、pBluescript II SK(+)、pKK223-3、pSC101や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有しているpUB110、pTZ4、pC194、 ρ 11、 ϕ 1、 ϕ 105等をベクターとして利用することができる。また、2種類以上の宿主内で自律複製が可能なプラスミドの例として、pHV14、TRp7、YEp7およびpBS7等をベクターとして利用することができる。

- [0025] ここでいう任意の宿主には、後述の実施例に記載したような大腸菌(*Escherichia coli*)が代表例として挙げられるが、大腸菌に限定されるものではなく、枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物菌株も含まれる。
- [0026] 酵母を宿主とした場合、プロモーター配列の具体例としては、*eno-1*プロモーター、ガラクトシダーゼプロモーター、アルコールオキシダーゼプロモーター等が挙げられる。プラスミドの具体例としては、酵母内で自律複製可能なpESC、pPIC、pAO、pMET、pYES、pTEF、pNMT等が挙げられるが、これらは大腸菌内でも自律複製可能である。宿主の具体例としては、*Saccharomyces*や*Schizosaccharomyces*、*Pichia*等が挙げられる。
- [0027] 本発明の製造方法には、酸性ホスファターゼ産生能を有する微生物および高等生物由来の細胞、酸性ホスファターゼをコードする遺伝子で形質転換された細胞そのものおよびこれら細胞の破碎物を使用することもできるが、該細胞、該細胞の破碎物および該細胞の破碎物を硫安沈殿やカラムクロマトグラフィー等の処理を行って精製した酸性ホスファターゼ活性を含む画分を担体に担持させた固定化物を使用することもできる。
- [0028] 前記の反応に使用するペントースとリン酸供与体のモル比は特に制限されないが、通常、どちらか一方が他方に対して1倍モルより多く存在する条件下で反応は行われる。例えば、リン酸供与体がペントースに対して1倍モルより多く20倍モル以下存在する条件下で行われる。しかしながら、リン酸供与体がペントースに対して多く存在する条件下で反応させることでペントース-5-リン酸エステルの生成量は増加するが、リン酸供与体がペントースに対して多く存在しすぎると、リン酸の産廃が多く発生してしまいプロセス上好ましくない。よって、好ましくはリン酸供与体がペントースに対して3倍モル以上7倍モル以下存在する条件下で行われる。
- [0029] 反応液中のペントースの濃度は特に制限されないが、通常、0.05～2Mの範囲で行われ、好ましくは0.1～1.0Mの範囲で行われる。
- [0030] 反応液中のリン酸供与体の濃度は、酸性ホスファターゼの酵素活性が阻害されない範囲であれば特に制限されないが、通常、0.05～2Mの範囲で行われ、好ましくは0.1

～1. OMの範囲で行われる。

- [0031] 反応液中の酸性ホスファターゼの活性値は、ペントース-5-リン酸エステルが生成する量が存在すれば特に制限されないが、通常、1～1000U/mLの範囲で行われ、好ましくは1.5U/mL以上存在する範囲で行われる。しかしながら、反応液中の酸性ホスファターゼの活性値を4U/mLまで下げてもペントース-5-リン酸エステルの生成量に変化はないが、4U/mLより下げるときペントース-5-リン酸エステルの生成量も低下していく。よって、より好ましくは反応液中の酸性ホスファターゼの活性値が4U/mL以上存在する範囲で行われる。
- [0032] 反応温度は、ペントース-5-リン酸エステルが生成する温度範囲であれば特に制限されないが、通常、20～40℃の範囲で行われ、好ましくは30～37℃の範囲で行われる。
- [0033] 反応液のpHは、ペントース-5-リン酸エステルが生成する範囲であれば特に制限されないが、通常、pHは3.0～6.0の範囲で行われ、好ましくは3.5～4.0の範囲で行われる。
- [0034] 酸性ホスファターゼの中にはマグネシウムイオン等の二価の金属イオンでホスファターゼ活性の向上が見られるものもあるため、必要に応じて二価の金属イオンのような多価金属化合物等を反応液中に存在させることができる。
- [0035] 前記の反応により、反応に使用するペントースに対応するペントース-5-リン酸エステルが得られる。D体のペントースからはD体のペントース-5-リン酸エステルが、L体のペントースからはL体のペントース-5-リン酸エステルが得られる。
- [0036] 本発明者らは、3位および4位の立体配置が(3S, 4R)または(3R, 4S)であるペントースを使用することにより、対応する3位および4位の立体配置が(3S, 4R)または(3R, 4S)であるペントース-5-リン酸エステルがそれぞれ選択的に得られることを見出した。すなわち、本発明の製造方法は、選択的にペントース-5-リン酸エステルを製造する方法として有用である。
- [0037] 例えば、リボース、アラビノース、2-デオキシリボースまたは1-メトキシ-2-デオキシリボースとピロリン酸またはピロリン酸のカリウム塩とを、*Shigella flexneri* (*Shigella la*属)、*Schwanniomyces occidentalis* (*Schwanniomyces*属)または*Aspergill*

us ficuum(Aspergillus属)由来の酸性ホスファターゼの存在下で反応させることにより、リボース-5-リン酸エステル、アラビノース-5-リン酸エステル、2-デオキシリボース-5-リン酸エ斯特ルまたは1-メトキシ-2-デオキシリボース-5-リン酸エ斯特ルがそれぞれ得られる。

[0038] 本発明の製造方法の一実施態様としては、例えば、所望のpHに調整したバッファー中にペントースとリン酸供与体を存在させ、そこに酸性ホスファターゼを加えて反応させる方法が挙げられる。

[0039] 前記の反応で得られるペントース-5-リン酸エ斯特ルは、反応液から金属塩として沈殿させる方法やカラムクロマトグラフィー等の公知の分離方法を用いて分離することができる。

[0040] 以下、実施例により本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものでは

ない。なお、以下の実験において生成した目的化合物の分析は高速液体クロマトグラフィー(以下、「HPLC」と略記する。)に依った。HPLC分析の条件を次に示す。

[0041] カラム:Shodex Asahipak NH2P-50 4E(昭和電工)

移動相:50mM リン酸二水素ナトリウム

検出器:示差屈折率計

また、培養して得られた菌体のホスファターゼ活性は、p-ニトロフェニルリン酸エ斯特ルからp-ニトロフェノール($\epsilon = 16600 M^{-1} cm^{-1}$ 、pH6.0)への変化を410nmの吸光度の増加を測定することにより求めた。ホスファターゼ活性の測定条件は次のとおりである。

[0042] 100mMの酢酸バッファー(pH6.0)、10mMのp-ニトロフェニルリン酸エ斯特ルを含む溶液に、実施例1で調製した培養菌体を添加して、37°Cで15分間反応させた。1NのNaOHを添加して反応を停止し、410nmにおける吸光度の増加を測定した。1ユニット(U)の定義を1分間に $1 \mu mol$ のp-ニトロフェニルを遊離することができる酵素量とした。

[参考例1]

公知のShigella flexneri 2a YSH6000に由来する酸性ホスファターゼ配列を

もとに、配列番号1および配列番号2に示した2種のプライマーを作成し、*Shigella flexneri* 2a YSH6000由来の酸性ホスファターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドを鋳型としてPCRを行った。10mMのKOD-plusバッファー、1. 5 μMのフォワードおよびリバースプライマー、1mMの硫酸マグネシウム、0. 2mMのdNTPs、2 UのKOD-plusポリメラーゼ(TOYOBO)、50ng/μLの鋳型DNAからなる反応溶液を作成した。94°Cで2分間保持した後、94°Cで30秒間、60°Cで30秒間、68°Cで1分間のサーマルサイクルを30サイクル行った後、最後に68°Cで10分間保持した。その結果、約0. 75kbの增幅断片が得られた。得られた断片をPstI/BamHI処理し、pUC19に連結した。作成したプラスミドを用いて大腸菌DH5α株を形質転換して、ホスファターゼ活性の発現株を作成した。

[0043] バッフル付フラスコにLB broth(Difco)を調製し、120°C、20分間殺菌後、作成したホスファターゼ活性の発現株を植菌して、37°C、120rpmで振とう培養した。遠心分離によって菌体を回収したところ、1Lの培養液から湿重量で3. 37gの菌体が得られた。なお、この菌体の活性値は4930Uであった。

実施例 1

[0044] 100mMの酢酸バッファー(pH3. 5)、100mMのピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液(pH3. 5)、100mMのD-2-デオキシリボースを含む溶液に、参考例1で調製した培養菌体を用いて反応液中の活性値が7. 3U/mL(5mg湿菌体/mL)となるように調整した菌体液を添加して、37°Cで1時間反応させた。反応液をHPLC分析した結果、1. 5mMのD-2-デオキシリボース-5-リン酸エステルが生成していた。

実施例 2

[0045] 100mMの酢酸バッファー(pH3. 5)、100mMのD-2-デオキシリボースを含む溶液に、100mM~700mMの濃度となるようにピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液(pH3. 5)を添加し、参考例1で調製した培養菌体を用いて反応液中の活性値が7. 3U/mL(5mg湿菌体/mL)となるように菌体液を添加して、37°Cで反応させた。反応液をHPLC分析した結果を図1に示した。

実施例 3

[0046] 100mMの酢酸バッファー(pH3.5)、700mMのピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液(pH3.5)、100mMの各種ペントースを含む溶液に、参考例1で調製した培養菌体を用いて反応液中の活性値が7.3U/mL(5mg湿菌体/mL)となるように菌体液を添加して、37°Cで1時間反応させた。基質として用いた各種ペントースは、L-2-デオキシリボース、D-リボース、D-アラビノース、L-アラビノースである。反応液をHPLC分析した結果、L-2-デオキシリボースより9.6mMのL-2-デオキシリボース-5-リン酸エステル、D-リボースより16.6mMのD-リボース-5-リン酸エステルD-アラビノースより4.9mMのD-アラビノース-5-リン酸エステル、L-アラビノースより2.8mMのL-アラビノース-5-リン酸エステルが生成していた。

実施例 4

[0047] 100mMの酢酸バッファー(pH3.5)、100mMのピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液(pH3.5)、100mMのD-2-デオキシリボースを含む溶液に、参考例1で調製した培養菌体を用いて反応液中の活性値が0.73~7.3U/mL(0.5~5.0mg湿菌体/mL)となるように菌体液を添加して、37°Cで1時間反応させた。反応液をHPLC分析した結果を図2に示した。

実施例 5

[0048] 2Mのピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液(pH4.0)、2MのD-2-デオキシリボースを含む溶液2mLに、*Schwanniomyces occidentalis* IFO1840に由来するフィターゼの調製液を60μL(150U)添加して、37°Cで4時間反応させた。*Schwanniomyces occidentalis* IFO1840に由来するフィターゼの調製は、特開平11-206368に記載の方法に依った。反応液をHPLC分析した結果、15mMのD-2-デオキシリボース-5-リン酸エステルが生成していた。

実施例 6

[0049] 0.33gのピロリン酸カリウム、2.5gの2-デオキシリボースを含む溶液を塩酸にてpH4.5に調整し、5mLに希釈した。これにAspergillus ficuum NRRL3135に由来するフィターゼ(SIGMA)を25mg(100U)添加して、37°Cで1時間反応させた。反応液をHPLC分析した結果、22mMのD-2-デオキシリボース-5-リン酸エステルが生成していた。

実施例 7

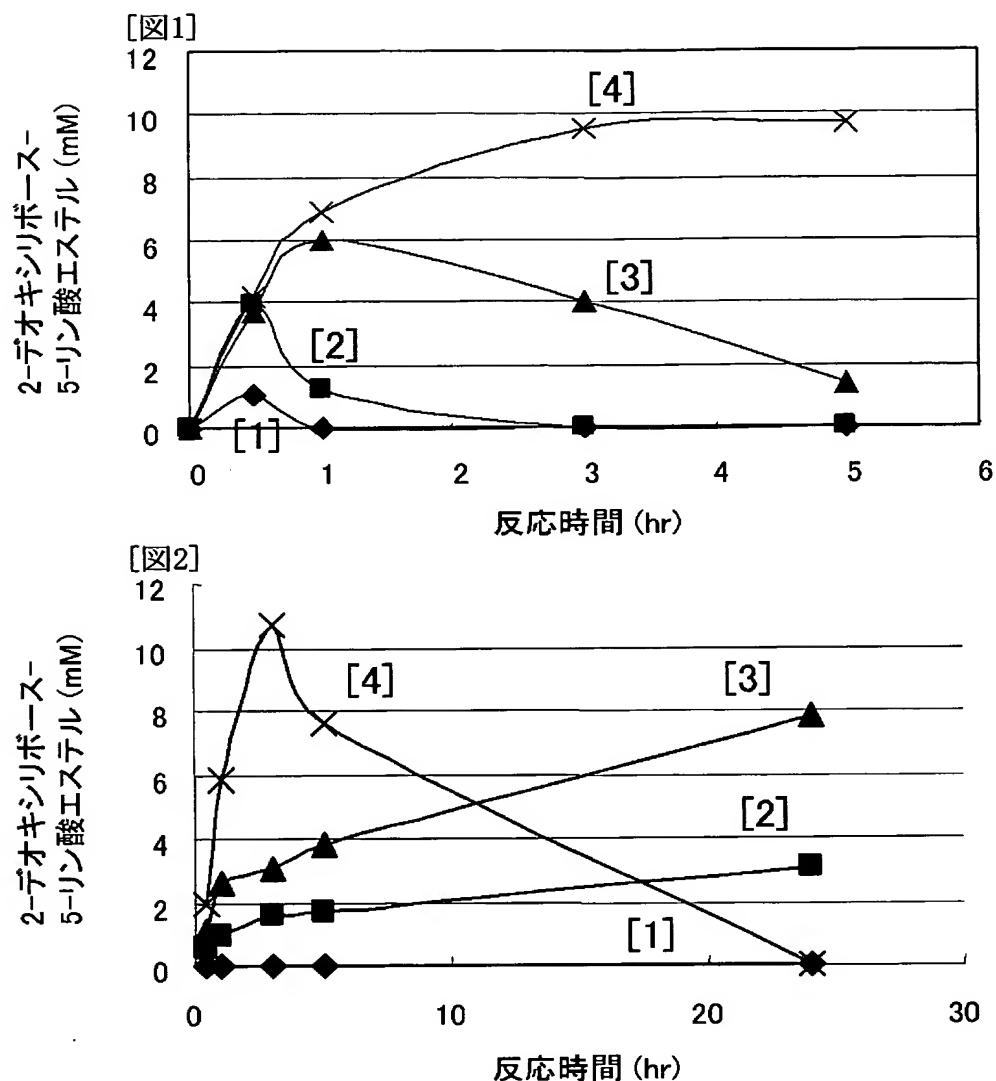
[0050] 2Mのピロリン酸とピロリン酸カリウムの混合溶液(pH4.0)、2Mの1-メキシ-D-2-デオキシリボースを含む溶液1.5mLに、参考例1で調製した培養菌体を用いて反応液中の活性値が3.9U/mL(4mg湿菌体/mL)となるように菌体液を添加して、37°Cで22時間反応させた。また、それとは別に、実施例6で用いたSchwanniomyces occidentalis IFO1840に由来するフィターゼの調製液30μL(75U)を添加した反応液、実施例7で用いたAspegillus ficuum NRRL3135に由来するフィターゼ7.5mg(20U)を添加した反応液も同様に調整して、5時間反応させた。反応液をHPLC分析した結果、調製した培養菌体を添加した場合で300mM、Schwanniomyces occidentalis IFO1840に由来するフィターゼを添加した場合で20mM、Aspegillus ficuum NRRL3135に由来するフィターゼを添加した場合で30mMの1-メキシ-D-2-デオキシリボース-5-リン酸エステルが生成していた。

産業上の利用可能性

[0051] 本発明は、ヌクレオシド類を合成する出発物質として有用なペントース-5-リン酸エステルを簡便に製造する方法として有用である。

請求の範囲

- [1] ペントースとリン酸供与体とを酸性ホスファターゼの存在下で反応させるペントースー5-リン酸エステルの製造方法。
- [2] ペントースが(3S、4R)または(3R、4S)のペントースであり、ペントースー5-リン酸エステルが(3S、4R)または(3R、4S)のペントースー5-リン酸エステルである、請求項1に記載の製造方法。
- [3] ペントースがリボース、アラビノース、2-デオキシリボースまたは1-メトキシ-2-デオキシリボースであり、ペントースー5-リン酸エステルがリボースー5-リン酸エステル、アラビノースー5-リン酸エステル、2-デオキシリボースー5-リン酸エステルまたは1-メトキシ-2-デオキシリボースー5-リン酸エステルである、請求項1に記載の製造方法。
- [4] リン酸供与体がポリリン酸又はその塩である、請求項1に記載の製造方法。
- [5] リン酸供与体がペントースに対して1倍モルより多く20倍モル以下存在する条件下で反応させる、請求項1に記載の製造方法。
- [6] 酸性ホスファターゼが1U/mL以上存在する条件下で反応させる、請求項1に記載の製造方法。
- [7] 酸性ホスファターゼがShigella属、Schwanniomyces属またはAspergillus属に由来する酸性ホスファターゼである、請求項1に記載の製造方法。
- [8] 酸性ホスファターゼがShigella flexneri、Schwanniomyces occidentalisまたはAspergillus ficuumに由来する酸性ホスファターゼである、請求項1に記載の製造方法。



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/016573

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P19/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P19/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/WPIIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | JP 9-37785 A (Ajinomoto Co., Inc.), 10 February, 1997 (10.02.97), Full text & EP 832970 A | 1-8 |

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

| | |
|--|--|
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family |
|--|--|

Date of the actual completion of the international search
01 December, 2004 (01.12.04)

Date of mailing of the international search report
21 December, 2004 (21.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int c17 C12P 19/44

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int c17 C12P 19/44

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/WPIIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | J P 9-37785 A (味の素株式会社) 1997.02.10, 文献全体 & E P 832970 A | 1-8 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.12.2004

国際調査報告の発送日

21.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

内藤 伸一

4B 8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3448